



Isolation, Purification, and Determination of Biochemical Properties of Catechol 1, 2 Dioxygenase from Microbial Flora in Petroleum-Contaminated Soils

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Rabbani F.¹ MSc,
Jafarian V.^{*1} PhD,
Asoodeh A.² PhD

How to cite this article

Rabbani F, Jafarian V, Asoodeh A. Isolation, Purification, and Determination of Biochemical Properties of Catechol 1, 2 Dioxygenase from Microbial Flora in Petroleum-Contaminated Soils. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):217-224.

ABSTRACT

The present study was accomplished to isolate, purify, and biochemically characterize the phenol-degrading enzyme from the bacteria existed in petroleum-contaminated soils. The catechol 1, 2 dioxygenase was extracted from *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 and purified using Q-Sepharose ion exchange chromatography column. The enzyme activity was examined under different pHs (ranged from 4 to 9), at different temperatures (ranged from 20 to 70°C), in the presence of various metal ions chloride salts (Ca^{2+} , K^{+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} and Na^{+}), and with various solvents (ethanol, ethyl acetate, petroleum ether, acetonitrile, N-amyl alcohol, N-hexane, and toluene). In addition, the enzyme activity was investigated using different substrates such as phenol, catechol, benzoic acid, pyrogallol, and α -naphthol. SDS-PAGE analysis indicated that there was a single-band protein with a molecular weight of approximately 40kDa. The catechol 1, 2 dioxygenase had a maximum activity at 30°C and pH= 8.5. Moreover, the catalytic activity of the enzyme was increased in the presence of cobalt chloride and zinc chloride ions (5mM) as well as organic solvent of amyl alcohol, while it was decreased or inhibited in the presence of the other metal ions and organic solvents used. Among different substrates, catechol was the most favorable for the enzyme, so that, the $V_{\max}$ and K_m were 8.959U/mg and 4.992 μM /ml for the substrate, respectively.

Keywords Petroleum Pollutant; Phenol Degradation; Protein Purification; Catechol 1, 2 Dioxygenase

¹Biology Department, Science Faculty, University of Zanjan, Zanjan, Iran

²Chemistry Department, Science Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

*Correspondence

Address: Biology Department, Science Faculty, University of Zanjan, University Boulevard, Zanjan, Iran.
Postal Code: 4537138791.
Phone: +98 (24) 33052531
Fax: +98 (24) 33052543
v.jafarian@znu.ac.ir

Article History

Received: May 14, 2019

Accepted: April 14, 2020

ePublished: June 10, 2020

CITATION LINKS

- [1] Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by *Oerskovia* sp ... [2] Microbial remediation of petroleum contaminated soils and the role of rhizosphere ... [3] Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial ... [4] Properties of catechol 1, 2-dioxygenase in the cell free extract and immobilized ... [5] Purification and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase ... [6] Microbial degradation of ... [7] Biodegradation kinetics of phenol and catechol using ... [8] Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of ... [9] Catechol 1, 2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: Quantitative structure/activity relationship and the crystal ... [10] Purification and characterization of a novel catechol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas* ... [11] Purification and characterization of catechol-1, 2-dioxygenase ... [12] Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil ... [13] High activity catechol 1, 2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool ... [14] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein ... [15] Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catecho ... [16] Structural roles of the active site iron (III) ions in catechol 1, 2-dioxygenases and differential secondary structure changes ... [17] Structural roles of the active site iron (III) ions in catechol 1, 2-dioxygenases and differential secondary structure changes ... [18] Interactions of cyclic hydrocarbons with biological ... [19] Effects of organic solvents on the enzyme activity of Subtilisin ... [20] Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease ... [21] Enzymes and proteins containing manganese ... [22] Thermodynamics of protein folding: Methodology, data analysis ...

جداسازی، خالص‌سازی و تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز از فلور میکروبی خاک‌های آلوده نفتی

فائزه ربانی MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

وهب جعفریان* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

احمد آسوده PhD

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

مطالعه حاضر با هدف جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی بیوشیمیایی آنزیم تجزیه‌کننده فنول از باکتری‌های موجود در خاک‌های حاوی آلاینده‌های نفتی انجام شد. پروتئین کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 استخراج و با استفاده از ستون کروماتوگرافی تبادل یونی Q- سفارز تخلیص شد. فعالیت آنزیم در pHهای مختلف بین ۴ تا ۹، محدوده دمایی ۲۰ تا ۷۰°C و در حضور نمک کلرید یون‌های فلزی مختلفی مانند Ca^{2+} , K^{+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} و Na^{+} و حلال‌های گوناگون شامل اتانول، اتیل استات، پترولیوم‌اتر، استونیتریل، ان- آمیل‌الکل، ان- هگزان و تولوئن ارزیابی شد. همچنین فعالیت این آنزیم با استفاده از سوبستراهای گوناگون مانند فنول، کتکول، بنزوئیک‌اسید، پیروگالول و آلفا- نفتول بررسی شد. آنالیز پروتئین به روش SDS-PAGE بیانگر وجود تک‌باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۰ کیلودالتون بود. آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز در pH= ۸/۵ و دمای ۳۰°C بیشترین فعالیت را داشت. فعالیت کاتالیتیکی آنزیم در حضور یون‌های کلرید کبالت و کلرید روی (۵ میلی‌مولار) و همچنین حلال آلی آمیل‌الکل افزایش یافت، ولی دیگر یون‌های فلزی و حلال‌های آلی به‌کاررفته باعث کاهش و یا مهار فعالیت آنزیم شدند. از میان سوبستراهای مختلف، کتکول سوبسترای بسیار مطلوب‌تری برای آنزیم بود، به‌طوری که V_{max} و K_m آنزیم برای این سوبسترا به ترتیب ۸/۹۵۹ واحد بر میلی‌گرم و ۴/۹۹۲ میکرومول بر میلی‌لیتر است.

کلیدواژه‌ها: آلاینده نفتی، تجزیه فنول، تخلیص پروتئین، کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۶

*نویسنده مسئول: v.jafarian@znu.ac.ir

مقدمه

گسترش چشمگیر صنعت در چند دهه اخیر، مشکلات آلودگی محیط زیست و پساب‌های خطرناک را با خود به همراه داشته است [1]. آلودگی آب توسط ترکیبات آلی و معدنی ناشی از فرآورده‌های نفتی امروزه موجب نگرانی عمومی شده است [2]. آلودگی‌های نفتی از قبیل هیدروکربن‌های آروماتیک مانند فنول و مشتقات آن که پایدارترین و سمی‌ترین قسمت نفت را تشکیل می‌دهند، به‌ویژه در کشورهای نفت‌خیز همچون ایران به‌عنوان یک مشکل اجتناب‌ناپذیر به شمار می‌آیند [3]. امروزه فنول در بسیاری از صنایع به‌عنوان ماده خام اولیه کاربرد دارد. با این حال به‌عنوان

آلاینده‌ای مهم، توسط فاضلاب بسیاری از صنایع وارد محیط زیست می‌شود و به‌دلیل ویژگی‌های جهش‌زایی و سرطان‌زایی، سلامتی انسان‌ها و سایر موجودات را در معرض خطر جدی قرار می‌دهد [4]. از این رو، توجه و تلاش‌های بسیاری برای دستیابی به فناوری‌های پاک‌سازی و بازیابی جزیی یا کامل فنول از مناطق آلوده شده است.

در میان روش‌های گوناگون در حذف فنول، تیمار زیستی به‌دلیل بازدهی بالا و تولید محصولات نهایی بی‌ضرر و سازگار با محیط از اهمیت بالایی برخوردار است. میکروارگانیسم‌های موجود در منابع آلوده، کاتالیزورهای توانمندی برای تجزیه زیستی ترکیبات سمی به‌صورت هوازی و بی‌هوازی هستند و به‌صورت انتخابی از آنها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها از جمله منابع باارزش برای تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیک مانند فنول و مشتقات آن به شمار می‌آیند [5، 6]. در تجزیه ترکیبات آروماتیک توسط میکروارگانیسم‌ها، کتکول نقشی اساسی دارد که به‌صورت یک ترکیب حد واسطه شکل می‌گیرد و همچنین سمیت آن از فنول بیشتر و بنابراین حذف آن از آلاینده‌ها بسیار مهم است [7]. کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز، آنزیمی کلیدی در مسیر تجزیه ترکیبات آروماتیک است. فعالیت این آنزیم به شکسته‌شدن حلقه آروماتیک کتکول و تولید سیس، سیس-موکونیک‌اسید منجر می‌شود و سمیت آن را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد [8، 9]. بررسی‌های گوناگونی روی آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز انجام شده است. در پژوهشی این آنزیم از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از بنزوئیک‌اسید به‌عنوان منبع کربن و انرژی خالص‌سازی شد که دارای ویژگی‌های خاص از جمله وزن مولکولی کم و فعالیت در شرایط اسیدی بود [10]. همچنین این آنزیم از باکتری تجزیه‌کننده فنول، *Rhodococcus sp.* جداسازی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت [5]. میلار [11] به جداسازی و شناسایی آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز از باکتری تجزیه‌کننده فنول *Acinetobacter sp.* پرداخت. این سویه توانایی تجزیه آگرم بر لیت‌ر فنول را داشت. در مطالعه‌ای نیز این آنزیم از سه سویه متفاوت *Rhodococcus pyridinivorans*، *Ochrobactrum intermedium* و سودوموناس YL8 خالص‌سازی شد و پس از بررسی تجزیه مواد فنولی توسط این سویه‌ها دریافتند که آنزیم‌های کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز استخراج و خالص‌سازی شده از سویه‌های گوناگون عملکرد و کارایی گوناگونی تحت شرایط مختلف دارند [12].

بنابراین با توجه به ضرورت حذف آلاینده‌های نفتی از محیط و نیز بازیابی آنها از طریق روش‌های زیستی، مطالعه حاضر در راستای جداسازی و تخلیص آنزیم کتکول‌آو۲دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* که از خاک‌های آلوده نفتی واقع در مناطقی از کرمانشاه جداسازی شده بود، انجام شد تا با مطالعه پایداری و فعالیت بیوشیمیایی این آنزیم در حضور مواد

مطالعه ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم خالص شده

سنجش فعالیت آنزیم در pH های مختلف، بین ۴ تا ۹ به فاصله نیم واحد از یکدیگر با استفاده از سه سیستم بافری سدیم استات، سدیم فسفات و بورات در دمای ۳۰°C با سوبسترای کتکول انجام شد. همچنین برای یافتن دمای بهینه، فعالیت آنزیم در محدوده دمایی ۲۰ تا ۷۰°C با فواصل ۵°C توسط سوبسترای کتکول در ۸/۵ pH به دست آمد. به منظور بررسی اثر نمک های مختلف بر فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز از نمک کلرید یون های فلزی مختلفی مانند K^+ ، Ca^{2+} ، Mn^{2+} ، Co^{2+} ، Zn^{2+} ، Mg^{2+} و Cu^{2+} و Na^+ در سه غلظت ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار، در دمای ۳۰°C و ۸/۵ pH و در حضور سوبسترای کتکول در مقایسه با یون آهن به عنوان شاهد استفاده شد. اثر حلال های اتانول، اتیل استات، پترالیوم تر، استونیتیل، ان- آمیل الکل، ان- هگزان و تولوئن با غلظت های ۱۰ و ۲۰٪ نیز در دمای ۳۰°C و ۸/۵ pH و در حضور سوبسترای کتکول انجام شد.

برای تعیین سوبسترای مناسب به منظور بررسی فعالیت آنزیم مورد نظر از غلظت ۱۰ میلی مولار سوبستراهای فنول، کتکول، پایروگالول، بنزوئیک اسید و آلفا- نفتول استفاده شد. فعالیت آنزیم برای هر یک از سوبستراهای مورد نظر، در دمای ۳۰°C و ۸/۵ pH در مقایسه با نمونه شاهد (دارای سوبسترا و فاقد آنزیم) سنجیده شد.

بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشتناپذیر

نمونه آنزیمی خالص شده به همراه بافر بهینه (بورات با ۸/۵ pH) در دماهای ۲۰، ۳۰، ۴۵ و ۶۰°C با فاصله های زمانی صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه گرماگذاری (انکوبه) و سپس بلافاصله به یخ منتقل شد. نمونه ها پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون از یخ خارج شدند و فعالیت نسبی آنها در سه تکرار در دمای ۳۰°C اندازه گیری شد. این آزمایش در سه روز و سه تکرار انجام شد.

بررسی سینتیکی آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز

به منظور محاسبه K_m و V_{max} آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز، فعالیت آن در دما و pH بهینه در غلظت های صفر، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی مولار سوبسترا سنجیده شد. با استفاده از نرم افزار GraPhpad prism 6 و با رسم مقادیر جذب های به دست آمده در برابر هر غلظت، نمودار میکائیلیس- منتن و با معکوس کردن داده های هر محور نمودار لینویربرگ به دست آمد و مقادیر K_m و V_{max} محاسبه شدند.

تعیین غلظت کتکول طی واکنش آنزیمی با HPLC

به منظور تعیین غلظت کتکول به عنوان سوبسترای بهینه و میزان حذف آن طی واکنش آنزیمی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) طبق روش بریگانتی و همکاران [15] استفاده شد. به این منظور واکنش آنزیمی در زمان های صفر، ۴، ۸ و ۱۲ دقیقه با جوشاندن به مدت ۵ دقیقه متوقف شد و پس از سرد شدن برای تعیین غلظت سوبسترای باقیمانده مورد استفاده

مختلف شیمیایی و سوبستراهای گوناگون، گامی به سوی استفاده گسترده از این نوع آنزیم در صنعت زیست پالایی برداشته شود.

مواد و روش ها

گزینش باکتری

در این مطالعه از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* که پیش تر فعالیت فنولازی آن در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی دانشگاه زنجان مشخص شده بود، استفاده شد. این باکتری از خاک شیل های نفتی مربوط به ارتفاعات منطقه دودان (N ۳۵°۰۳'۲۳" و E ۴۶°۱۱'۸۰") واقع در غرب استان کرمانشاه جداسازی و پس از بررسی های مولکولی (شناسایی توالی 16S rDNA) با عنوان *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 نامگذاری شده بود.

جداسازی و خالص سازی آنزیم

فرآیند جداسازی و تخلیص آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز طبق روش نداف و قوش [5] انجام شد. خالص سازی آنزیم پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تلقیح باکتری به محیط کشت بهینه انجام گرفت. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ و رسوب باکتری حاصل، با افزودن ۲ میلی لیتر بافر فسفات به حالت سوسپانسیون در آورده شد. سوسپانسیون تحت سونیکاسیون قرار گرفت. سپس سلول های شکسته شده با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای استفاده در مراحل بعدی جدا شد. کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از ستون Q- سفارز طی دو مرحله و با استفاده از بافر سدیم فسفات ۲۰ میلی مولار با pH های برابر ۷/۸ و ۸/۵ انجام شد. به منظور تعیین وزن مولکولی آنزیم خالص شده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید- سدیم دودوسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم

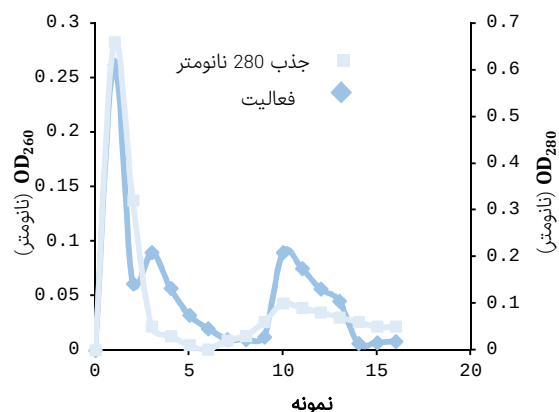
تعیین فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز به روش اسپکتروفتومتری با اندازه گیری جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر براساس تولید محصول سیس، سیس-موکونیک اسید انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۳۹۰ میکرو لیتر محلول بافر بوریک اسید (۵۰ میلی مولار؛ pH= ۸) و ۱۶۰ میکرو لیتر کتکول (۱۰ میلی مولار)، ۲۰۰ میکرو لیتر سولفات آهن (۵۰ میلی مولار)، و ۲۰۰ میکرو لیتر آسکوربیک اسید (۲۰ میلی مولار) بود. پس از افزودن ۵۰ میکرو لیتر آنزیم (با غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر) به مخلوط واکنش، ویال ها در حمام آب گرم ۳۰°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. در نمونه شاهد، به جای آنزیم از محلول بافر بوریک اسید ۵۰ میلی مولار استفاده شد. ضریب خاموشی محصول اکسیده شدن کتکول برابر ۱۶۸۰۰ بر مول بر سانتی متر است. یک واحد از فعالیت آنزیم برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند امیکرومول محصول در مدت زمان ۱ دقیقه در دمای ۳۰°C تولید کند [13]. غلظت آنزیم به روش

قرار گرفت. با رسم منحنی استاندارد کتکول در غلظت‌های ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۱۲، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی‌مولار بر حسب سطح زیر پیک نمودار در هر غلظت و با استفاده از معادله حاصل از آن با توجه به غلظت سوپسترای باقیمانده در نمونه و مقدار کتکول موجود در ابتدای واکنش، میزان حذف آن محاسبه شد.

یافته‌ها و بحث

استخراج و تخلیص پروتئین کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05

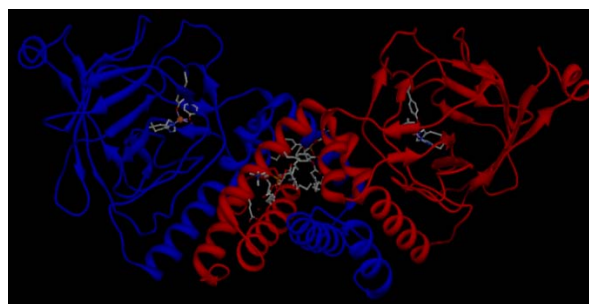
پس از استخراج آنزیم کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 و دیالیز نمونه، تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Q-سفارز (pH= ۷/۸) و با عبور بافر فسفات در همین pH و همچنین در غلظت‌های نمکی ۰/۱ تا ۰/۵ مولار سدیم کلرید انجام و تعداد ۱۶ نمونه از ستون جمع‌آوری شد. میزان نسبی پروتئین و فعالیت آنزیمی در هر نمونه اندازه‌گیری شد. با توجه به فعالیت آنزیمی و حداکثر میزان نسبی پروتئین نمونه اول (نمونه متصل‌نشده به ستون) نسبت به سایر نمونه‌ها (غلظت‌های نمکی)، این نمونه دوباره پس از دیالیز در pH= ۸/۵ در ستون Q-سفارز بارگذاری و کروماتوگرافی انجام شد. فعالیت و میزان نسبی پروتئین در نمونه اول بیشترین میزان فعالیت آنزیمی بود (نمودار ۱). غلظت پروتئین خروجی با رسم منحنی استاندارد برادفورد در حضور آلبومین سرم گاوی مورد بررسی قرار گرفت و آنزیم پس از غرق‌شدن در نیتروژن مایع با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شد.



نمودار ۱) تخلیص آنزیم در pH= ۸/۵

برای درک بهتر نحوه عمل آنزیم استخراج‌شده، مدل سه‌بعدی ساختار آنزیم کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز توسط نرم‌افزار کایمرا ۱-۱۴ با استفاده از پایگاه داده پروتئین (PDB) براساس مدل 1MPY و شباهت عملکرد (در مصرف سوپسترای کتکول) رسم شد (شکل ۱). با توجه به بررسی الگوی ساختاری ۲۱ نوع آنزیم کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز، به نظر می‌رسد آنزیم کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز استخراج‌شده از باکتری *Aneurinibacillus migulanus*

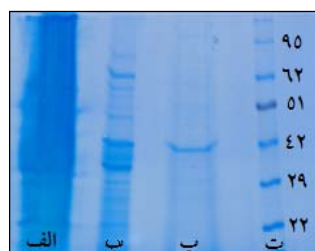
Isolate ZNU05 نیز الیگومر و در هر مونومر یک جایگاه فعال وجود داشته باشد. این گروه از آنزیم‌ها حدوداً متشکل از ۳۰۰ باقیمانده اسید آمینه هستند و در جایگاه فعال آنها باقیمانده‌های آمینواسیدی ترئونین، پرولین و تیروزین وجود دارند، به‌طوری که اسید آمینه پرولین در این جایگاه بسیار حفاظت‌شده است. با توجه به اسیدهای آمینه جایگاه فعال آنزیم، این جایگاه قطبی است و به نظر می‌رسد سوپسترا در مسیر حرکت خود به سمت جایگاه فعال از یک کانال آب‌گریز عبور می‌کند. نتایج حاصل از مطالعات دیگر حاکی از این است که تقریباً تمام اعضای خانواده کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز هومودایمر و دارای یک کوفاکتور آهن (III) در هر مونومر هستند [15, 16]. بنا بر گزارش‌های پیشین، آنزیم کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز استخراج‌شده از باکتری *Pseudomonas arvilla* موردی استثنایی و حاوی دو زیرمجموعه بسیار متجانس است که می‌تواند یک هموئید یا هتروداایمر باشد. این آنزیم شبیه به شکل بومرنگ است و به همین ترتیب می‌تواند به‌وضوح به سه حوزه شامل دو حوزه کاتالیزوری که در هر انتهای بومرنگ ساکن هستند و یک حوزه لینکر در مرکز، تقسیم شود [17]. در مرکز حوزه لینکر، تونل آب‌گریز قرار دارد که دو فسفولیپید در هر انتهای آن متصل است [18].



شکل ۱) مدل سه‌بعدی ساختار آنزیم کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز جداسازی و تخلیص‌شده از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 رسم‌شده توسط نرم‌افزار کایمرا

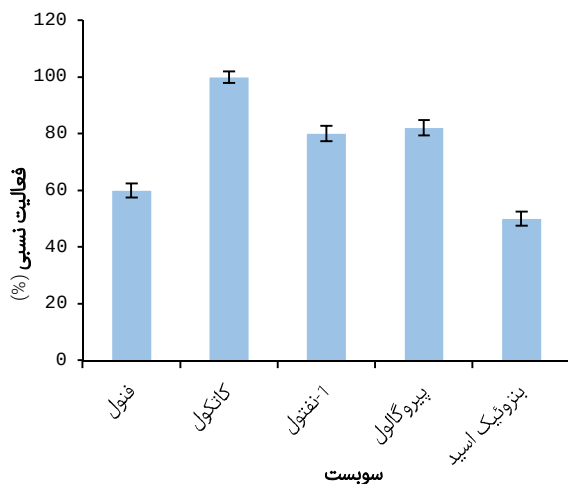
SDS-PAGE و تعیین غلظت پروتئین

پس از بیان و تخلیص پروتئین کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Q-سفارز، الکتروفورز به روش SDS-PAGE حاکی از وجود تک‌باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۰ کیلودالتون بود (شکل ۲).



شکل ۲) ژل الکتروفورز آنزیم کتکول و ۲۱ دی‌اکسیژناز: الف) عصاره خام؛ ب) نمونه ۱ ستون در مرحله اول؛ پ) آنزیم خالص؛ ت) مارکر وزن مولکولی (کیلودالتون)

حضور سوپسترای کتکول مشاهده شد (نمودار ۳). کتکول سوپسترای اصلی این آنزیم است و سوپستراهای به کاررفته دیگر در مسیر تجزیه خود ابتدا به کتکول تبدیل می شوند و به نظر می رسد سرعت آنزیم در تجزیه سوپسترای کتکول نسبت به سوپستراهای دیگر بیشتر است. با توجه به نتایج حاصل از شکست حلقه آروماتیک کتکول، این آنزیم می تواند تثبیت و در زیست پالایی فاضلاب های آلوده به کتکول استفاده شود.



نمودار ۳) اثر سوپستراهای مختلف بر فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز

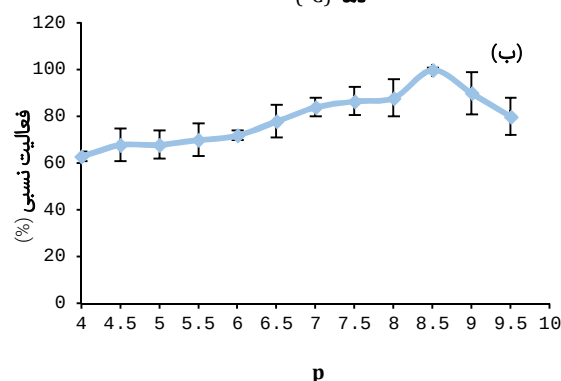
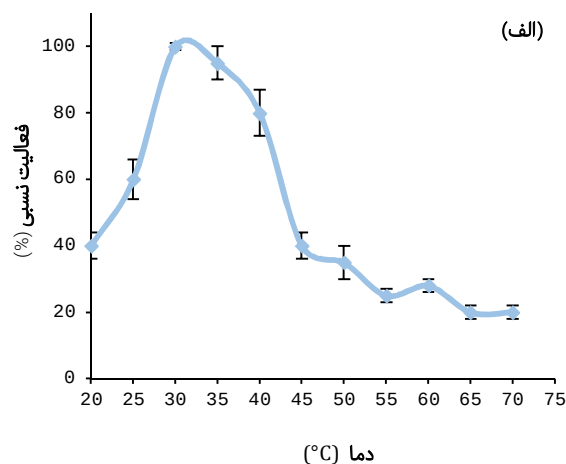
در مطالعه ماتر و همکاران [9]، کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز جداسازی شده از باکتری *R. opacus*، فعالیت بالایی نسبت به کتکول و متیل کتکول نشان داد. همچنین در میان تعدادی از مشتقات کتکول مورد آزمایش در مطالعه ونگ و همکاران [10]، بالاترین فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز حاصل از باکتری *P. aeruginosa* در حضور سوپسترای پایروگالول بود.

اثر برخی حلال های آلی و یون های مختلف فلزی بر فعالیت آنزیم
حلال های آلی بر میان کنش های الکتروستاتیک پروتئین ها اثر می گذارند، چراکه ثابت دی الکتریک آنها با آب متفاوت است. به طور کلی کاهش خاصیت قطبی حلال و کاهش ثابت دی الکتریک سبب افزایش دافعه الکتروستاتیک و منجر به باز شدن ساختار پروتئین ها می شود [19].

معیار استفاده از حلال های مختلف بررسی اثر قطبیت حلال بر فعالیت آنزیم است. نتایج بررسی فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز در حضور حلال های آلی به کاررفته شامل اتانول، اتیل استات، پترالیوم اتر، استونیتریل، ان- آمیل الکل، ان- هگزان و تولوئن با غلظت های ۱۰ و ۲۰٪ نشان داد که اتانول، استونیتریل، تولوئن و ان- آمیل الکل که ترکیبات دوقطبی با درجه قطبیت متفاوت هستند، باعث افزایش فعالیت آنزیم شدند، در حالی که حلال های ان- هگزان، اتیل استات و پترالیوم اتر که ترکیبات غیرقطبی به شمار می آیند، فعالیت آنزیم را متوقف کردند (نمودار ۴) [20]. با توجه به قطبیت حلال های آلی و مدل ارایه شده برای آنزیم مورد مطالعه، به نظر می رسد حلال آلی آمیل الکل از سر

بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در دماها و pH های گوناگون

بررسی نتایج تاثیر pH بر فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز نشان داد که این آنزیم در محدوده pH مورد مطالعه قادر به فعالیت است و بیشترین فعالیت آن در pH= ۸/۵ مشاهده شد (نمودار ۲). همچنین بررسی نتایج تاثیر دما بر فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم در دمای ۳۰°C رخ می دهد (نمودار ۲).



نمودار ۲) اثر دما (الف) و pH های (ب) مختلف بر میزان فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز

در بسیاری از مطالعات، pH بهینه برای آنزیم مورد نظر در محدوده قلیایی گزارش شده است. از جمله این مطالعات می توان به مطالعه سیلو و همکاران [4] روی آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز استخراج شده از باکتری *Mycobacterium fortuitum* با حداکثر فعالیت در دمای ۴۵°C و pH= ۸ و مطالعه نداف و قوش [5] روی آنزیم استخراج شده از باکتری *Rhodococcus sp.* با حداکثر فعالیت در دمای ۳۰°C و pH= ۷/۵ اشاره کرد.

اثر سوپستراهای مختلف بر فعالیت آنزیم کتکول ۲۱ و ۲۰ دی اکسیژناز

آنزیم مورد مطالعه در حضور تمام سوپستراهای به کاررفته شامل فنول، کتکول، بنزوئیک اسید، پیروگالول و آلفا- نفتول (۱۰ میلی مولار) بیش از ۵۰٪ فعالیت خود را حفظ کرد و بر این اساس می توان آن را برای زیست پالایی در خاک های آلوده به هیدروکربن های مختلف، به کار برد. حداکثر فعالیت آنزیم در

سبب افزایش فعالیت آنزیم شوند. نتایج مشابهی در مطالعات انجام شده روی آنزیم کتکول^۱ و^۲دی اکسیژناز استخراج شده از *Mycobacterium fortuitum* توسط سیلو و همکاران^[4] و *P. aeruginosa* توسط وانگ و همکاران^[10] نشان دادند که فعالیت این آنزیم در حضور یونهای آهن و جیوه تحریک و در حضور یونهای مس، آمونیوم و منگنز مهار می شود.

بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشتناپذیر

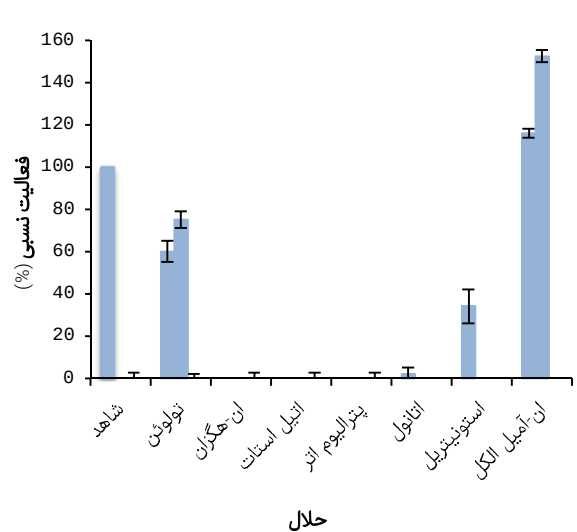
پس از انکوبه کردن آنزیم در یک دمای خاص تغییرات ساختاری آنزیم رخ می دهد که در تفسیر مبتنی بر ترمودینامیک کلاسیک آماری می توان گفت که در برگشت به دمای پایین، بر حسب دما و مدت زمان انکوباسیون، تغییر ساختار در بخشی از جمعیت مولکولی برگشتناپذیر است و این تعداد از مولکولهای آنزیم، ساختار طبیعی خود را کسب نمی کنند که متناسب با این تغییرات ساختاری برگشتناپذیر، از فعالیت آنزیم کاسته می شود^[12]. نتایج حاصل از آزمایشهای غیرفعال شدگی برگشتناپذیر ناشی از حرارت (نمودار ۶)، نشان می دهد که آنزیم کتکول^۱ و^۲دی اکسیژناز، بر حسب شرایط انکوباسیون، با شیب متفاوتی دچار افت فعالیت شده است که این تفاوت در روند کاهش فعالیت، بازتابی از تغییرات ساختاری برگشتناپذیر است. اگر این تغییر رفتار، به طور کیفی در منحنی مقایسه شود، مشاهده می شود که کمترین روند کاهش فعالیت در در دمای ۳۰°C رخ داده است که البته این دما، همان دمای بهینه فعالیت آنزیم است. علاوه بر این، در مقایسه کمی داده ها، مشخص شد که مدت زمان لازم برای کاهش فعالیت به نصف مقدار اولیه در این نمونه، ۳۰ دقیقه است که در مقایسه با نمونه های دیگر، طولانی تر و بازتابی از پایداری ساختاری آنزیم در این شرایط است. همچنین، بهترین زمان ممکن برای واکنش آنزیم با سوبسترا، پس از ۱۰ دقیقه محاسبه شد. نتایج این بررسی نشان می دهد که دمای ۳۰°C که به عنوان دمای بهینه گزارش شده است، دمایی است که در آن آنزیم بیشترین پایداری حرارتی را در شیوه انکوباسیون دمایی از خود نشان می دهد.

تعیین غلظت کتکول با HPLC

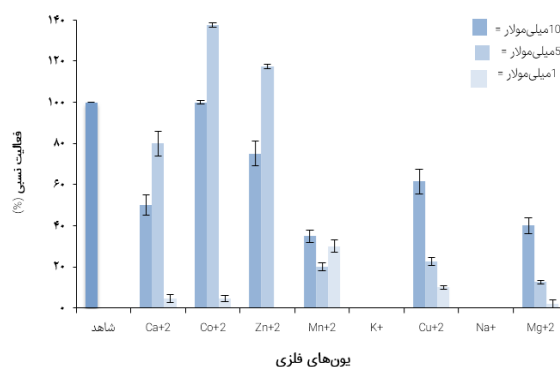
نمونه ها توسط دستگاه HPLC با استفاده از ستون C₁₈ (۴۶×۲۵۰ میلی متر) بررسی شدند. بدین منظور، متانول- آب حاوی ۱٪ اسیداستیک (حجمی/حجمی) به عنوان محلول در جریان ۰/۸ میلی لیتر و طول موج ۲۷۷ نانومتر استفاده شد. براساس منحنی استاندارد کتکول، غلظت باقیمانده کتکول طی واکنش آنزیمی توسط دستگاه HPLC محاسبه شد (نمودار ۷). نتایج نشان دهنده کاهش غلظت کتکول طی واکنش آنزیمی و در نتیجه تجزیه آن به وسیله آنزیم کتکول^۱ و^۲دی اکسیژناز بود (نمودار ۸).

از میان سوبستراهای مختلف، کتکول سوبسترای مطلوب تری برای فعالیت آنزیم بود. نتایج محاسبه سینتیکی آنزیم کتکول^۱ و^۲دی اکسیژناز برای سوبسترای کتکول نشان داد که مقادیر V_{max} و K_m آنزیم به ترتیب ۸/۹۵۹ واحد بر میلی گرم و ۴/۹۹۲ میکرومول بر میلی لیتر است.

قطبی خود با جایگاه فعال و از سر غیرقطبی با کانال آب گریز در مسیر عبور سوبسترا میان کنش برقرار کرده است و سبب تسریع حرکت سوبسترا به سمت جایگاه فعال آنزیم و افزایش فعالیت آن می شود. البته مهار فعالیت آنزیمها در حلالهایی آلی نظیر ان-هگزان، اتیل استات و پترالیوم اثر می تواند ناشی از تخریب ساختار آنزیم نیز باشد^[19]. همچنین نتایج بررسی فعالیت آنزیم کتکول^۱ و^۲دی اکسیژناز در حضور یونهای مختلف فلزی شامل Ca^{2+} , K^{+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} و Na^{+} نشان داد که بیشتر یونهای فلزی سبب کاهش یا مهار فعالیت آنزیم می شوند، در حالی که یونهای کبالت و روی در غلظت ۵ میلی مولار سبب افزایش فعالیت آنزیم شدند (نمودار ۵).



نمودار ۴) اثر حلالهای آلی بر فعالیت آنزیم کتکول^۱ و^۲دی اکسیژناز



نمودار ۵) اثر غلظت های مختلف یونهای فلزی بر فعالیت آنزیم کتکول^۱ و^۲دی اکسیژناز

آنزیم کتکول^۱ و^۲دی اکسیژناز در ساختار خود حاوی یونهای آهن و جیوه است و در بیشتر مطالعات حضور این یونها در مخلوط واکنش آنزیمی به دلیل داشتن نقش ساختاری و کاتالیتیک، سبب افزایش فعالیت آنزیم می شود^[9, 21]. با توجه به اینکه یونهای کبالت و روی با یونهای آهن و جیوه در یک گروه قرار دارند، انتظار می رود که این یونها رفتار مشابهی از خود نشان دهند و

نتیجه گیری

مطالعه حاضر اولین گزارش در مورد استخراج و خالص سازی آنزیم کتکول ۲ و ۱ اکسیژناز از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 است که طی دو مرحله خالص سازی انجام شد. تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی تبادل یونی Q- سفارز و آنالیز پروتئین به روش SDS-PAGE انجام شد. نتایج بیانگر وجود تک باند پروتئینی با وزن مولکولی تقریباً ۴۰ کیلودالتون است. همچنین pH و دمای مطلوب برای آنزیم کتکول ۲ و ۱ اکسیژناز به ترتیب ۸/۵ و ۳۰°C بود. فعالیت این آنزیم در pH های متفاوت مزیتی برای استفاده از آن در تصفیه فاضلاب ها بر حسب pH آنها است. فعالیت کاتالیتیکی آنزیم در حضور یون های کلرید کبالت و روی و همچنین حلال آلی آمیل الکل افزایش می یابد، در حالی که در حضور دیگر یون های فلزی و حلال های آلی به کاررفته، کاهش پیدا می کند و یا به طور کلی مهار می شود. بنابراین می توان گفت که پایداری آنزیم در حلال آلی تحت تاثیر عوامل مختلف مثل ماهیت حلال، خواص آنزیم، مقدار آب مورد نیاز برای کاتالیز و کنفورماسیون آنزیم قرار می گیرد. کتکول سوبسترای بسیار مطلوب تری برای آنزیم کتکول ۲ و ۱ اکسیژناز است. نتایج غیرفعال شدگی حرارتی نشان داد که کمترین روند کاهش فعالیت ناشی از انکوباسیون دمایی، در دمای ۳۰°C است و این دما را می توان به عنوان دمای بهینه برای پایداری ساختاری و منطبق بر فعالیت بهینه آنزیم تایید کرد. به نظر می رسد که یافته های این مطالعه می تواند باعث ترغیب پژوهشگران برای مطالعه بیشتر روی آنزیم کتکول ۲ و ۱ اکسیژناز استخراج شده از باکتری *Aneurinibacillus migulanus* Isolate ZNU05 به منظور کاربرد در سطح صنعتی شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از همکاری موثر گروه شیمی دانشگاه فردوسی مشهد و مجموعه آزمایشگاه های تحقیقاتی دانشگاه زنجان در انجام مطالعه حاضر سپاسگزاری می کنند.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان مورد تایید و به نشریه دیگری ارسال و یا چاپ نشده است.

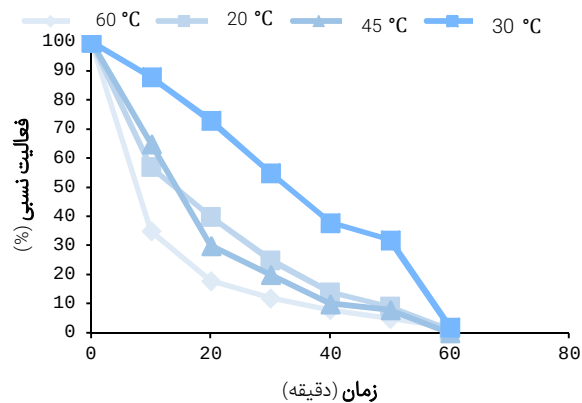
تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاتحه ربانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ وهب جعفریان (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ احمد آسوده (نویسنده سوم)، روش شناس/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)

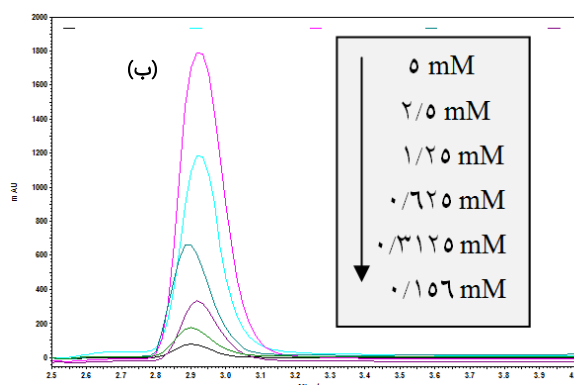
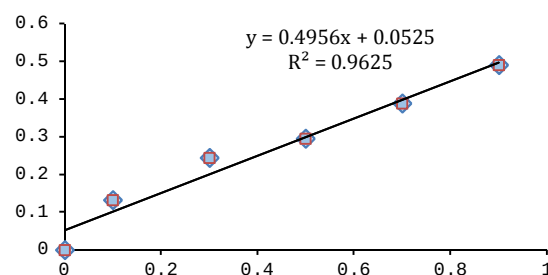
منابع مالی: این مطالعه مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد و با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان انجام شده است.

منابع

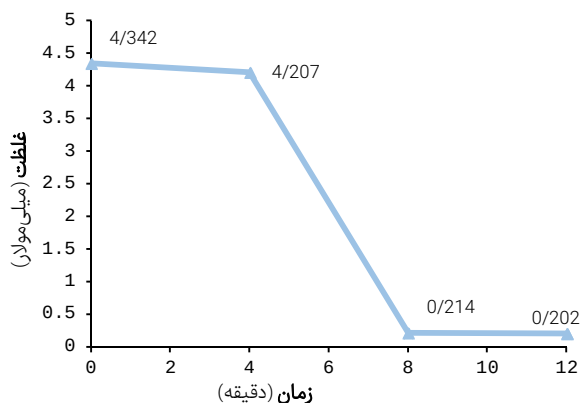
1- Lješević M, Gojgić-Cvijović G, Ieda T, Hashimoto S, Nakano T, Bulatović Sh, et al. Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by



نمودار ۶) نمودار غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم کتکول ۲ و ۱ اکسیژناز در دماها و زمان های مختلف



نمودار ۷) نمودار استاندارد کتکول؛ الف) سطح زیر نمودار در غلظت های مختلف کتکول؛ ب) نمودار HPLC غلظت های مختلف کتکول



نمودار ۸) میزان غلظت کتکول باقیمانده طی واکنش آنزیمی کتکول ۲ و ۱ اکسیژناز بر حسب زمان

of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium. *Biodegradation*. 2012;23(6):823-35.

13- Guzik U, Hupert-Kocurek K, Sitnik M, Wojcieszynska D. High activity catechol 1, 2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in cis, cis-muconic acid production. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013;103(6):1297-307.

14- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.

15- Briganti F, Pessione E, Giunta C, Scozzafava A. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1, 2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. *FEBS Lett*. 1997;416(1):61-4.

16- Di Nardo G, Tilli S, Pessione E, Cavaletto M, Giunta C, Briganti F. Structural roles of the active site iron (III) ions in catechol 1, 2-dioxygenases and differential secondary structure changes in isoenzymes A and B from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Arch Biochem Biophys*. 2004;431(1):79-87.

17- Nakai C, Kagamiyama H, Saeki Y, Nozaki M. Nonidentical subunits of pyrocatechase from *Pseudomonas arvilla* C-1. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(1):12-22.

18- Sikkema J, De Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*. 1994;269(11):8022-8.

19- Bargeshadi Z, Pazhang Y, Jamei R. Effects of organic solvents on the enzyme activity of Subtilisin Carlsberg protease. *J Mol Cell Res*. 2019;32(2):236-46. [Persian]

20- Ruiz DM, De Castro RE. Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2007;34(2):111-5.

21- Crowley JD, Traynor DA, Weatherburn DC. Enzymes and proteins containing manganese: An overview. *Met Ions Biol Syst*. 2000;37:209-78.

22- Shirdel SA, Khalifeh K. Thermodynamics of protein folding: Methodology, data analysis and interpretation of data. *Eur Biophys J*. 2019;48(4):305-16.

Oerskovia sp. followed by comprehensive GC× GC-TOF MS. *J Hazard Mater*. 2019;363:227-32.

2- Besharati H. Microbial remediation of petroleum contaminated soils and the role of rhizosphere in microorganisms efficiency. *Iran J Soil Res*. 2015;28(3):573-84. [Persian]

3- Logeshwaran P, Megharaj M, Chadalavada S, Bowman M, Naidu R. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ Technol Innov*. 2018;10:175-93.

4- Silva AS, Jacques RJ, Andreazza R, Bento FM, Roesch LF, Camargo FA. Properties of catechol 1, 2-dioxygenase in the cell free extract and immobilized extract of *Mycobacterium fortuitum*. *Braz J Microbiol*. 2013;44(1):291-7.

5- Nadaf NH, Ghosh JS. Purification and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. NCIM 2891. *Res J Environ Earth Sci*. 2011;3(5):608-13.

6- Mishra VK, Kumar N. Microbial degradation of phenol: A review. *J Water Pollut Purif Res*. 2017;4(1):17-22.

7- Kumar A, Kumar Sh, Kumar S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem Eng J*. 2005;22(2):151-9.

8- Juhasz AL, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2000;45(1-2):57-88.

9- Matera I, Ferraroni M, Kolomytseva M, Golovleva L, Scozzafava A, Briganti F. Catechol 1, 2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: Quantitative structure/activity relationship and the crystal structures of native enzyme and catechols adducts. *J Struct Biol*. 2010;170(3):548-64.

10- Wang CL, You SL, Wang SL. Purification and characterization of a novel catechol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source. *Process Biochem*. 2006;41(7):1594-601.

11- Milase RN. Purification and characterization of catechol- 1, 2- dioxygenase from *Acinetobacter* sp. Strain Y64 and *Escherichia coli* transformants [Dissertation]. Durban: University of KwaZulu-Natal; 2015.

12- Thavamani P, Megharaj M, Naidu R. Bioremediation